



New MT-ND6 and NDUFA1 mutations in mitochondrial respiratory chain disorders

Uehara, Natsumi

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2014-09-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第6242号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1006242>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)

学位論文の内容要旨

New MT-ND6 and NDUFA1 mutations in mitochondrial respiratory chain disorders

ミトコンドリア呼吸鎖異常症における新規 MT-ND6 および NDUFA1 遺伝子変異

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻

耳鼻咽喉頭頸部外科学

(指導教員：丹生 健一教授)

上原 奈津美

【目的】

ミトコンドリア呼吸鎖異常症 (MRCD) は、いかなる症状、臓器・組織、何歳でもどんな遺伝形式でも起こりうる。特に小児では臨床症状は非特異的で診断が困難である。原因はミトコンドリア DNA (mtDNA) と核 DNA の異常の両方ある。しかし同定されている原因遺伝子変異は少ない。我々は MRCD の新規原因遺伝子変異の同定を目的に本研究を行った。

【方法】

今回我々は、臨床症状および皮膚線維芽細胞もしくは罹患臓器を用いた BN-PAGE (blue native polyacrylamide gel electrophoresis) や呼吸鎖酵素活性の結果、複合体活性の低下で診断した小児 MRCD90 例を対象とした。インフォームドコンセントのもと採取した患者由来の組織から DNA を抽出し、mtDNA の全周シーケンスを以下的方法で行い変異解析した。mtDNA には核に pseudogene があることが知られており、mtDNA(全周 16,569bp)を 6.5kb, 11.2kb の fragment として 1st-PCR を行い、その産物を鋳型として 2nd-PCR を行い、直接シーケンスを行った。ただし 7 例については、Ion PGM™ sequencer を用いて mtDNA の全周シーケンス解析を行った。新規の mtDNA 変異が病因か鑑別するために、2 例で Cybrid Study を用いた。その結果 2 例中 1 例は mtDNA 変異が病因ではなかったため、エクソーム全周解析を行った。

【結果】

mtDNA 全周シーケンス解析の結果、多型のみが 61 例、多型以外の変異を認めた症例が 29 例だった。このうち、既知病因変異は 13 例、新規変異は欠失 3 例と点変異が 13 例だった。欠失 3 例は 1st-PCR の電気泳動結果、線維芽細胞および肝臓由来の DNA で、それぞれ Control と比べてかなり小さいサイズの band を認めた。これらの症例に対し直接シーケンス解析で欠失部位の確認を行った。欠失範囲はそれぞれ、3424 bp (nt12493-15916)、6639 bp (nt7734-14372)、5424 bp (nt8574-13997) と同定できた。臨床像は、肝臓障害の強い肝症 1 例、致死的乳児ミトコンドリア病 1 例、欠失症例が多く報告されている Pearson 症候群の 1 例であった。

同定した新規点変異を認めた 13 例のうち 2 例について cybrid study を行い、病因が mtDNA か核 DNA かを鑑別した。残りの 11 例は、核 DNA が病因と考えられる ComplexII 欠損症 1 例、酵素活性の低下部位と変異位置が異なり病因か判定が困難な 5 例、Cybrid study で検証困難な線維芽細胞で酵素活性の低下がみられない、もしくは変異率が低い 4 例であり cybrid study から除いた。Cybrid study を行った 2 例は、m.14439G>A (*MT-ND6*) と m.1356A>G (*mitochondrial 12S rRNA*) の変異をもつどちらも ComplexI 欠損症で Leigh 脳症の症例だった。その結果、m.14439G>A (*MT-ND6*) は原因遺伝子変異と同定できたが、m.1356A>G (*mitochondrial 12S rRNA*) は多型と考えられた。

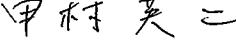
mtDNA 変異が病因ではなかった 1 例について、さらにエクソーム全周解析を行い核 DNA

の病因遺伝子を検索した。その結果、過去に MRCD の原因遺伝子として報告があり ComplexI の subunit である *NDUFA1* に新規変異 c.55C>T (*NDUFA1*) を認めた。ComplexI の欠損が、*NDUFA1* の変異によるものか確かめるために NDUFA1 を overexpression させたところ、ComplexI の発現量が増加した。よって c.55C>T (*NDUFA1*) は原因遺伝子変異と考えられた。

【考察】小児MRCDでは特に臨床症状が様々であり、今回の結果でも既知病因変異を認めた症例は少なく mtDNA 全周シーケンスの必要があると考えられた。さらに今回新規に同定した欠失3例のうち、2例はCPEO、KSS、Pearson症候群など典型的なmtDNAの欠失を疑う症状がなく、簡便なmtDNAの欠失・重複のスクリーニングは重要である。

今回同定したm.14439G>A はND6proteinの中でも保存された領域にあり、またND6は MRCDの中でもLeigh脳症やMELAS、LHONの原因遺伝子変異のhot spotであった。一方で多型と考えられたm.1356A>G 変異のある *mitochondrial 12S rRNA*はアミノグリコシド難聴や非症候性難聴の原因遺伝子変異のhot spotだが症候性のミトコンドリア病の報告はない。

今回用いたCybrid StudyはmtDNAと核DNA異常の鑑別に非常に良い方法であった。しかし検体の細胞種の選択に限界があり、時間もかかる。我々は、MRCDと生化学的に診断された症例について、系統的にmtDNA全周シーケンスを行い病因として疑わしい変異がmtDNAになければ、併せてエクソーム全周解析を行うことが核変異の同定に有用と考えた。その結果分子生物学的な診断がつくことで、より的確な遺伝子カウンセリングへ導くことが期待できる。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 2455 号	氏名	上原 奈津美
論文題目 Title of Dissertation	ミトコンドリア呼吸鎖異常症における新規 MT-ND6 および NDUFA1 遺伝子変異 New MT-ND6 and NDUFA1 mutations in mitochondrial respiratory chain disorders		
審査委員 Examiner	主査 Chief Examiner  副査 Vice-examiner  副査 Vice-examiner 		
	(要旨は 1,000 字～2,000 字程度)		

【目的】

ミトコンドリア呼吸鎖異常症（MRCD）は、いかなる症状、臓器・組織、何歳でもどんな遺伝形式でも起こりうる。特に小児では臨床症状は非特異的で診断が困難である。原因是ミトコンドリアDNA（mtDNA）と核DNAの異常の両方ある。しかし同定されている原因遺伝子変異は少ない。我々はMRCDの新規原因遺伝子変異の同定を目的に本研究を行った。

【方法】

今回我々は、臨床症状および皮膚線維芽細胞もしくは罹患臓器を用いたBN-PAGEや呼吸鎖酵素活性の結果、複合体活性の低下で診断した小児MRCD90例を対象とした。患者由来の組織からDNAを抽出し、mtDNAの全周シーケンスを以下の方法で行い変異解析した。mtDNAには核にpseudogeneがあることが知られており、mtDNA(全周 16,569bp)を 6.5kb, 11.2kb の fragmentとして1st-PCRを行い、その産物を鋳型として2nd-PCRを行い、直接シーケンスを行った。新規の mtDNA 変異が病因を鑑別するために、2例で Cybrid Study を用いた。その結果 2 例中 1 例は mtDNA 変異が病因ではなかったため、エクソーム全周解析を行った。

【結果】

mtDNA 全周シーケンス解析の結果、多型のみが 61 例、多型以外の変異を認めた症例が 29 例だつ

た。このうち、既知病因変異は 13 例、新規変異は欠失 3 例と点変異が 13 例だった。欠失 3 例は 1st-PCR の電気泳動結果、線維芽細胞および肝臓由来の DNA で、それぞれ Control と比べてかなり小さいサイズの band を認めた。これらの症例に対し直接シーケンス解析で欠失部位の確認を行った。欠失範囲はそれぞれ、3424 bp (nt12493-15916)、6639 bp (nt7734-14372)、5424 bp (nt8574-13997) と同定できた。臨床像は、肝臓障害の強い肝症 1 例、致死的乳児ミトコンドリア病 1 例、欠失症例が多く報告されている Pearson 症候群の 1 例であった。

同定した新規点変異を認めた 13 例のうち 2 例について cybrid study を行い、病因が mtDNA か核 DNA かを鑑別した。残りの 11 例は、核 DNA が病因と考えられる ComplexII 欠損症 1 例、酵素活性の低下部位と変異位置が異なり病因か判定が困難な 5 例、Cybrid study で検証困難な線維芽細胞で酵素活性の低下がみられない、もしくは変異率が低い 4 例であり cybrid study から除いた。Cybrid study を行った 2 例は、m.14439G>A (MT-ND6) と m.1356A>G (mitochondrial 12S rRNA) の変異をもつどちらも ComplexI 欠損症で Leigh 脳症の症例だった。その結果、m.14439G>A (MT-ND6) は原因遺伝子変異と同定できたが、m.1356A>G (mitochondrial 12S rRNA) は多型と考えられた。

mtDNA 変異が病因ではなかった 1 例について、さらにエクソーム全周解析を行い核 DNA の病因遺伝子を検索した。その結果、過去に MRCD の原因遺伝子として報告があり ComplexI の subunit である NDUFA1 に新規変異 c.55C>T (NDUFA1) を認めた。ComplexI の欠損が、NDUFA1 の変異によるものか確かめるために NDUFA1 を overexpression させたところ、ComplexI の発現量が増加した。よって c.55C>T (NDUFA1) は原因遺伝子変異と考えられた。

【考察】小児MRCDでは特に臨床症状が様々であり、今回の結果でも既知病因変異を認めた症例は少なく mtDNA 全周シーケンスの必要があると考えられた。

今回同定した m.14439G>A は ND6 protein 中でも保存された領域にあり、また ND6 は MRCD 中でも Leigh 脳症や MELAS、LHON の原因遺伝子変異の hot spot であった。一方で多型と考えられた m.1356A>G 変異のある mitochondrial 12S rRNA はアミノゲリコシド難聴や非症候性難聴の原因遺伝子変異の hot spot だが症候性のミトコンドリア病の報告はない。

今回用いた Cybrid Study は mtDNA と核 DNA の鑑別に非常に良い方法であった。我々は、MRCD と生化学的に診断された症例について、系統的に mtDNA 全周シーケンスを行い病因として疑わしい変異が mtDNA になければ、併せてエクソーム全周解析を行うことが核変異の同定に有用と考えた。その結果分子生物学的な診断がつくことで、より的確な遺伝子カウンセリングへ導くことが期待できる。

本研究は、多数のミトコンドリア呼吸鎖異常症を、次世代シーケンサー、サイブリッド解析も駆使して解析し新規の変異を同定した。重要な知見を得たものとして価値ある業績と認める。よって、本研究は、博士（医学）の学位を得る資格があるものと認める。